



# UNIVERSIDAD DE LA RIOJA

## TRABAJO FIN DE ESTUDIOS

Título

Recuperación de suelos de viñedo degradados: análisis microbiológicos de los suelos y caracterización agronómica.

Autor/es

SANDRO TURTURRO PÉREZ DE LOS COBOS

Director/es

MARÍA FERNANDA RUIZ LARREA y MARÍA PAZ DIAGO SANTAMARÍA ,

Facultad

Escuela de Máster y Doctorado de la Universidad de La Rioja

Titulación

Máster Universitario en Química y Biotecnología

Departamento

AGRICULTURA Y ALIMENTACIÓN

Curso académico

2017-18



***Recuperación de suelos de viñedo degradados: análisis microbiológicos de los suelos y caracterización agronómica.***

, de SANDRO TURTURRO PÉREZ DE LOS COBOS

(publicada por la Universidad de La Rioja) se difunde bajo una Licencia Creative Commons Reconocimiento-NoComercial-SinObraDerivada 3.0 Unported.

Permisos que vayan más allá de lo cubierto por esta licencia pueden solicitarse a los titulares del copyright.

© El autor, 2018

© Universidad de La Rioja, 2018

[publicaciones.unirioja.es](http://publicaciones.unirioja.es)

E-mail: [publicaciones@unirioja.es](mailto:publicaciones@unirioja.es)

**Trabajo de Fin de Máster**

**Recuperación de suelos de  
viñedo degradados:  
análisis microbiológicos  
de los suelos  
y caracterización agronómica.**

Autor:

**Sandro Turturro Pérez de los Cobos**

**Tutor/es:** María Fernanda Ruiz Larrea y María Paz Diago Santamaría

**MÁSTER:**

**Máster en Química y Biotecnología (760M)**

**Escuela de Máster y Doctorado**



**UNIVERSIDAD  
DE LA RIOJA**

**AÑO ACADÉMICO: 2017/2018**

## ÍNDICE

<b>Índice de tablas</b> .....	I
<b>Índice de figuras</b> .....	II
<b>Abreviaturas</b> .....	V
<b>Resumen</b> .....	1
<b>Abstract</b> .....	2
<b>Introducción</b> .....	3
1. El viñedo .....	3
2. Cultivo ecológico .....	5
3. Microbiología del suelo .....	8
3.1. <i>Factores que influyen en la microbiota del suelo</i> .....	9
3.2. <i>Familias de microorganismos relevantes para los suelos de viñedo</i> ....	10
<b>Objetivos</b> .....	13
<b>Materiales y Metodología</b> .....	14
1. Localización de la parcela .....	14
2. Tratamientos aplicados en el viñedo .....	14
3. Recogida de las muestras de suelos .....	15
4. Técnicas analíticas .....	17
4.1. Determinaciones agronómicas .....	17
4.2. Análisis de cuantificación los compuestos fenólicos y de antocianinas .....	17
4.3. Determinación del grado Brix .....	18
4.4. Técnicas estadísticas (ANOVA) .....	18
5. Análisis microbiológico de las muestras de suelo .....	19
5.1. Medios de cultivo .....	19
5.2. Preparación de las muestras .....	20
5.3. Tinción de Gram .....	21
6. Datos de Meteorología .....	21
<b>Resultados y Discusión</b> .....	22
1. Resultados de los análisis microbiológicos de los suelos .....	22
2. Resultados de la producción y calidad de la uva.....	24
3. Datos meteorológicos .....	31
4. Análisis de componentes principales .....	34

<b>Conclusiones .....</b>	<b>35</b>
<b>Bibliografía .....</b>	<b>37</b>

## **Lista de tablas**

**Tabla 1.-** Composición de los medios de cultivo.

**Tabla 2.-** Análisis microbiológico general. Recuento de microorganismos, en diferentes medios de cultivo, obtenidos de suelos control y con diferentes tratamientos.

**Tabla 3.1-** Datos agronómicos. Resultado del rendimiento y producción de la vid en los diferentes tratamientos y controles.

**Tabla 3.2.-** Análisis químico de la composición de la uva

**Tabla 4.-** datos meteorológicos

## **Lista de figuras**

**Figura 1.-** Zona de estudio (letra C), tratamientos (números) y zona no degradada (punto azul C') en la Finca El Molino de Bodegas Puelles (Ábalos, La Rioja). La zona C había sido calificada por el enólogo de la bodega como suelo degradado, y la zona C' como suelo no degradado.

**Figura 2.1.-** Cepa seleccionada, calle y papel informativo para el tratamiento NOD (27-2-2018)

**Figura 2.2.-** Cepa seleccionada, calle y papel informativo para el tratamiento CON (27-2-2018)

**Figura 2.3.-** Cepa seleccionada, calle y papel informativo para el tratamiento EE (27-2-2018)

**Figura 2.4.-** Cepa seleccionada, calle y papel informativo para el tratamiento CH (27-2-2018)

**Figura 3.-** Población microbiana del suelo de cada una de las parcelas estudiadas. YPD: levaduras. ACTI: actinomicetos, descomponedores de materia orgánica. BURK: fijadores de nitrógeno. PCA: microorganismos aerobios totales. NOD: parcela no degradada. CON: parcela control degradada. EE: parcela recuperada con estiércol. CH: parcela con cubierta vegetal de cebada y haba. AA: parcela con cubierta vegetal de avena y alfalfa.

**Figura 4.1.-** Número medio de pámpanos por vid. NOD: parcela no degradada. CON: parcela control degradada. EE: parcela recuperada con estiércol. CH: parcela con cubierta vegetal de cebada y haba. AA: parcela con cubierta vegetal de avena y alfalfa.

**Figura 4.2.-** Número medio de racimos por vid. NOD: parcela no degradada. CON: parcela control degradada. EE: parcela recuperada con estiércol. CH: parcela con cubierta vegetal de cebada y haba. AA: parcela con cubierta vegetal de avena y alfalfa.

**Figura 4.3.-** Fertilidad media por vid. NOD: parcela no degradada. CON: parcela control degradada. EE: parcela recuperada con estiércol. CH: parcela con cubierta vegetal de cebada y haba. AA: parcela con cubierta vegetal de avena y alfalfa.

**Figura 4.4.-** Peso medio por racimo. NOD: parcela no degradada. CON: parcela control degradada. EE: parcela recuperada con estiércol. CH: parcela con cubierta vegetal de cebada y haba. AA: parcela con cubierta vegetal de avena y alfalfa.

**Figura 4.5.-** Producción media por vid. NOD: parcela no degradada. CON: parcela control degradada. EE: parcela recuperada con estiércol. CH: parcela con cubierta vegetal de cebada y haba. AA: parcela con cubierta vegetal de avena y alfalfa.

**Figura 4.6.-** Peso medio de 100 bayas. NOD: parcela no degradada. CON: parcela control degradada. EE: parcela recuperada con estiércol. CH: parcela con cubierta vegetal de cebada y haba. AA: parcela con cubierta vegetal de avena y alfalfa.

**Figura 4.7.-** Medida de los grados Brix de la uva. NOD: parcela no degradada. CON: parcela control degradada. EE: parcela recuperada con estiércol. CH: parcela con cubierta vegetal de cebada y haba. AA: parcela con cubierta vegetal de avena y alfalfa.

**Figura 4.8.-** Medida del pH del zumo de uva. NOD: parcela no degradada. CON: parcela control degradada. EE: parcela recuperada con estiércol. CH: parcela con cubierta vegetal de cebada y haba. AA: parcela con cubierta vegetal de avena y alfalfa.

**Figura 4.9.-** Concentración en mg de antocianos por gramo de baya. Se determinan a 520 nm. NOD: parcela no degradada. CON: parcela control degradada. EE: parcela recuperada con estiércol. CH: parcela con cubierta vegetal de cebada y haba. AA: parcela con cubierta vegetal de avena y alfalfa.



**Figura 4.10.-** Concentración en mg de antocianos por baya. Se determinan a 520 nm. NOD: parcela no degradada. CON: parcela control degradada. EE: parcela recuperada con estiércol. CH: parcela con cubierta vegetal de cebada y haba. AA: parcela con cubierta vegetal de avena y alfalfa.

**Figura 4.11.-** Concentración en mg de compuestos fenólicos por gramo de baya. Se determinan a 280 nm. NOD: parcela no degradada. CON: parcela control degradada. EE: parcela recuperada con estiércol. CH: parcela con cubierta vegetal de cebada y haba. AA: parcela con cubierta vegetal de avena y alfalfa.

**Figura 4.12.-** Concentración en mg de compuestos fenólicos por baya. Se determinan a 280 nm. NOD: parcela no degradada. CON: parcela control degradada. EE: parcela recuperada con estiércol. CH: parcela con cubierta vegetal de cebada y haba. AA: parcela con cubierta vegetal de avena y alfalfa.

**Figura 5.1.-** Humedad relativa del aire en el viñedo durante los 12 meses anteriores a la recogida de la muestra.

**Figura 5.2.-** Lluvia recogida en el viñedo durante los 12 meses anteriores a la recogida de la muestra.

**Figura 5.3.-** Radiación recibida en el viñedo durante los 12 meses anteriores a la recogida de la muestra.

**Figura 5.4.-** Temperatura del suelo del viñedo durante los 12 meses anteriores a la recogida de la muestra.

**Figura 6.-** Gráfica de componentes principales. CP1 se relaciona con la fertilidad, números de racimos y con la producción, mientras que CP2 se relaciona con los componentes fenólicos por baya y por gramo de baya.

## **Abreviaturas**

°C: grado centígrado

µg: microgramos

µl: microlitro

Acti: actinomicetos

AA: Cubierta verde de avena y alfalfa

CH: Cubierta verde de cebada y haba

CON: Suelo control (labrado)

DO: Denominación de Origen

DOCa: Denominación de Origen Calificada

DOP: Denominación de Origen Protegida

EE: Tratamiento de estiércol

g: gramo

h: hora

has.: hectáreas

hl: hectolitros

IGP: Indicación Geográfica Protegida

Kg: Kilogramo

l: litro

Log: logaritmo

m: metro

m<sup>2</sup>: metro cuadrado

M: molar

MAPAMA: Ministerio de Agricultura Pesca Alimentación y Medio Ambiente

ml: mililitro

Nº: número

NOD: Suelo control no degradado (sin labranza)

nm: nanómetro

OMG: organismos modificados genéticamente

PCA: Plate Count Agar

PS: peso seco de suelo

RCF: Relative Centrifugal Force, fuerza centrífuga relativa

RPM: revoluciones por minuto

Tª: temperatura

Tn: tonelada

UFC: unidades formadoras de colonias

W: vatio

YPD: Yeast extract Peptone Dextrose

## Resumen

Actualmente, la microbiota del suelo del viñedo se considera un factor clave para la calidad del vino y el carácter "terroir". El objetivo de este estudio fue analizar mediante cultivos microbiológicos la microbiota del suelo de parcelas de viñedo con cultivo ecológico sometidas a distintos tratamientos, así como el rendimiento y la calidad de la uva de cada una de las parcelas estudiadas. El sitio de muestreo fue un viñedo de La Rioja donde algunas áreas fueron evaluadas como degradadas en 2015 debido a la reducción del crecimiento de la vid y el rendimiento de la uva. En 2016 se implementaron los siguientes tratamientos: a) aplicación de estiércol, b) cobertura de avena y alfalfa, y c) cobertura de cebada y haba. Ambas cubiertas de hierba se manejaron como cubierta seca. Los muestreos de uvas y de los suelos se realizaron durante la cosecha 2017. Se tomaron cinco muestras de suelo distribuidas al azar en las áreas con cada uno de los tres tratamientos del suelo, en un área no degradada y en un área degradada no recuperada, con la misma ubicación geográfica y manejo ecológico. Se analizaron y cuantificaron las comunidades microbianas de: levaduras, bacterias fijadoras de nitrógeno, actinomicetos descomponedores de materia orgánica, y aerobios totales, presentes en los suelos. Se evaluó el rendimiento de las parcelas y la calidad de la uva.

Los resultados mostraron que en todos los casos el suelo del viñedo fue un gran reservorio de levaduras, y las principales diferencias se obtuvieron entre la parcela no degradada y la parcela recuperada con el abono de estiércol, la cual presentó los valores más elevados de fertilidad, de producción de uva y de poblaciones de microorganismos fijadores de nitrógeno, descomponedores y aerobios totales. El viñedo control con suelo no degradado y sin tratamientos fue el que mostró los valores más bajos de producción de uva y fertilidad, y el cultivo control con el suelo degradado y sin tratamientos mostró los valores más altos de contenido en compuestos fenólicos de las uvas. Resumiendo estos resultados podemos concluir que el manejo del cultivo del viñedo tiene un efecto sobre la microbiota presente en el suelo del viñedo y esta microbiota, especialmente las levaduras, podría desempeñar un papel relevante en el proceso de fermentación y elaboración del vino en la bodega.

## **Abstract**

Currently the vineyard soil microbiota is regarded as a key factor for wine quality and "terroir" character. The objective of this study was to analyze the soil microbiota of vineyard plots with organic culture subjected to different treatments through microbiological cultures, as well as its grape yield and quality. The sampling site was a vineyard located in Northern Spain (La Rioja), where some areas were assessed as degraded in 2015 due to their reduced vine growth and grape yield. In 2016 the following treatments were implemented: a) manure application, b) grass cover of oat and lucern, and c) grass cover of barley and faba bean. Both grass covers were managed as dry cover.

Samplings of grapes and soils were carried out during the 2017 vintage. Five soil samples were randomly distributed in the areas with each of the three soil treatments, in a non-degraded area and in a degraded not recovered area, with the same geographical location and ecological management. Each sample consisted of four soil top-layer cores scattered in a range of 12 m and pooled together. On the whole, a total of 25 soil samples were analysed. Samples were stored at -80°C until microbiological analysis. Soil microbial communities of yeast, nitrogen fixing bacteria, actinomyces and total aerobes were analysed and quantified. Grape yield and quality were assessed as number of bunches per vine, weight of produced grapes, weight of 100 berries and berry polyphenol content. Results showed that in all cases the vineyard soil was a large reservoir of yeast, and the main differences were obtained between the non-degraded area and the manure restored soil, which showed the highest grape production and the lowest polyphenol content per berry. Our results demonstrate the relevance of the vineyard soil as a yeast reservoir, and that given a geographic location, the vineyard management strategy plays a pivotal role in grape production and quality.

# INTRODUCCIÓN

## 1. El viñedo

En España la superficie plantada de viñedo según un informe del Ministerio de Agricultura Pesca Alimentación y Medio Ambiente (MAPAMA) publicado en 2016 ([www.mapama.gob.es/es/](http://www.mapama.gob.es/es/)), asciende a 959.535 has. Según el mismo informe, la superficie para la producción de uva de la comunidad autónoma de La Rioja fue de 46.854 hectáreas, de las cuales 46.668 hectáreas se consideraron como Denominación de Origen Protegida.

En una nota de prensa se declara que la producción de uva ha sido de 5.896 millones de kg en la campaña de 2016 que aportan una producción de vino y mosto de 42,5 millones de hl, de los que 20 millones son vino tinto/rosado, 18,8 son vino blanco y 3,7 son de mosto ([http://www.mapama.gob.es/es/prensa/170120datosinfovinoviembre\\_tcm30-385235.pdf](http://www.mapama.gob.es/es/prensa/170120datosinfovinoviembre_tcm30-385235.pdf)).

De la producción de vino, 15 millones de hectólitros se han declarado como vino para Denominación de Origen Protegida (DOP), 4 millones de hectólitros como vino con Indicación Geográfica Protegida (IGP) y 7 millones de hectólitros como vino para varietales. El resto de vino declarado corresponde al que será comercializado como vino sin Indicación Geográfica.

Desde la página web <http://www.larioja.org/agricultura/es> se puede descargar la estadística agraria regional del año 2015, donde se indica que en la comunidad autónoma se cultivaron 46.613 hectáreas de vides para producción de vino, y 5 hectáreas para la producción de uva de mesa. En la Comarca de la Rioja Alta, se cultivaron 22.186 hectáreas de vid, en la Rioja media se cultivaron 12.441 hectáreas de vid, una para uva de mesa, y en La Rioja baja se cultivaron 11.947 hectáreas de vid, 4 para uva de mesa.

La Denominación de Origen (DO) Rioja, según su página oficial <https://es.riojawine.com/es/home.html>, nace el 6 de junio de 1925, para proteger el vino distintivo de esta región, a la vez que sirve como certificación de calidad para el consumidor. La Denominación de Origen Calificada de España también protege a los vinos de La Rioja desde 1991, siendo el primer el primer producto en conseguirlo.

Dentro de la Denominación de Origen Calificada (DOCa) Rioja, hay 63.593 hectáreas de vid. Aunque solo aparezca el nombre de La Rioja en esta DOCa, hay 12.934 hectáreas cultivadas en Álava y 6.774 hectáreas cultivadas en Navarra.

Las razones de que los vinos de La Rioja sean tan distintivos se debe en parte al clima y en parte al terreno. Esta región se beneficia de las temperaturas suaves del clima mediterráneo y de las precipitaciones moderadas del clima atlántico. El tipo de suelo más característico de La Rioja también resulta muy adecuado para una viticultura de calidad, ya que tiene una estructura equilibrada (arenas, limos y arcillas), es ligeramente alcalino, pobre en materia orgánica y con moderada disponibilidad hídrica durante el verano (<https://es.riojawine.com/es/6-la-zona-de-produccion.html>).

El clima mediterráneo es un clima moderado, con veranos secos. En la clasificación de Köppen–Geiger se considera dentro del grupo de clima templado, con verano seco. Se puede subdividir a su vez en verano fresco, templado o cálido. Aunque este clima se le llame comúnmente mediterráneo, países como Chile, Sudáfrica y Australia también tienen regiones con este clima (Kottek, M. et al, 2006).

Las variedades de uva actualmente autorizadas por el Reglamento de la DOCa. Rioja son Tempranillo, Garnacha, Graciano, Mazuelo y Maturana tinta para la producción de vinos tintos y Viura, Malvasía, Garnacha blanca, Tempranillo blanco, Maturana blanca, Turruntés, Chardonnay, Sauvignon blanc y Verdejo para la producción de vinos blancos.

En este trabajo se estudiaron viñedos con la variedad Tempranillo. Esta variedad, autóctona de La Rioja, es la más cultivada en esta denominación de origen, con un 75% de las hectáreas. El Tempranillo es una variedad muy equilibrada en grado alcohólico, color y acidez, y con un paladar franco, suave y afrutado, que evoluciona a aterciopelado cuando envejece. Es una variedad sensible a enfermedades y plagas, a la sequía, y a altas temperaturas, pero es muy segura en el cuajado y tiene un ciclo de maduración corto.

## **2. Cultivo ecológico**

Según el MAPAMA, “el abono o fertilizante es un material cuya función principal es proporcionar elementos nutrientes a las plantas, ya que, el suelo no es capaz de abastecer las necesidades nutritivas de los cultivos. Los fertilizantes restituyen en los suelos los elementos nutritivos necesarios para cada cultivo, que las plantas han extraído, o que por erosión, lavado y retrogradación se han perdido”.

El MAPAMA define la producción ecológica, biológica u orgánica como “un sistema de gestión y producción agroalimentaria que combina las mejores prácticas ambientales junto con un elevado nivel de biodiversidad y de preservación de los recursos naturales, así como la aplicación de normas exigentes sobre bienestar animal, con la finalidad de obtener una producción conforme a las preferencias de determinados consumidores por los productos obtenidos a partir de sustancias y procesos naturales”.

Un vino ecológico se puede definir, por tanto, como el vino hecho a partir de uvas cultivadas en ecológico, sin la necesidad de usar fertilizantes sintéticos, ni realizar tratamientos con pesticidas sintéticos sobre las plantas o utilizar herbicidas. Hay que destacar que todos los ingredientes utilizados en la producción del vino también deben tener un origen ecológico, y que los microorganismos utilizados no deben ser organismos modificados genéticamente (OMG, o GMO por sus siglas en inglés).

Uno de los principales objetivos de la agricultura ecológica es aumentar y mantener la fertilidad del suelo. La fertilidad se define como la capacidad del suelo para sostener la producción vegetal a largo plazo, y para Trioli y Hofmann (2009) en el código de buenas prácticas vitivinícolas en el proyecto ORWINE, depende de la actividad de los organismos del suelo, su condición, su estructura, su suministro de humus y materia orgánica, junto al contenido equilibrado de nutrientes y la conservación del agua.

El laboreo del suelo es una práctica utilizada habitualmente para desherbar, descompactar y airear el suelo, pero a largo plazo no mantiene la estructura del suelo, y reduce la actividad de bacterias y lombrices. Este efecto se contrarresta con la siembra de un cultivo de cobertura de leguminosas y cultivos herbáceos, entre otros tratamientos (Trioli y Hofmann, 2009).



Otros beneficios del cultivo de cobertura son una mejora de la conservación del agua, debido al sistema radicular, la aportación de nutrientes a bacterias y lombrices del suelo ayuda a fijar el nitrógeno atmosférico y a estabilizar la fauna en el ecosistema del viñedo. Las variedades de cultivos que se emplean para esta cobertura son leguminosas (judía, trébol, alfalfa), gramíneas (centeno, avena, cebada) y crucíferas (colza, rábano, mostaza blanca). Se recomienda utilizar una mezcla de cultivos (plantas fijadoras de nitrógeno, herbáceas, plantas con flores). Lissarrague (2012) comenta que una de las ventajas de la cubierta vegetal es la inducción de un estrés hídrico moderado en la vid que mejora el contenido fenólico en la baya.

Otra manera de fertilizar el suelo es mediante el uso de abonos orgánicos sin componentes de síntesis, como el estiércol, el compost (abono y otra materia orgánica), restos de poda y orujo prensado.

El rendimiento es un parámetro que describe el peso de todos los racimos de una vid. Es uno de los parámetros que descende con el uso de la cubierta vegetal, y se estima que se debe a la competencia del agua y nutrientes a nivel de la raíz (Morlat y Jacquet, 2003). Lopes et al (2011) consiguió reducir la producción un 20% con una cubierta vegetal espontánea.

El peso de la baya, al igual que la producción, es un parámetro que se ve afectado por el efecto competitivo de la cubierta. El estrés producido consigue parar el crecimiento de la baya, estimulando la translocación de azúcares y la acumulación de compuestos fenólicos (Ojeda 2007). El peso del racimo es uno de los componentes productivos de la vid que también se ve afectado por la acción de la cubierta, reduciendo su peso en algo menos del 10%. Este parámetro se calcula dividiendo la producción por el número de racimos (Lopes et al 2011).

La fertilidad es un parámetro que indica el número de racimos en cada pámpano, y que como el resto de los parámetros también se reduce cuando hay cubierta. La reducción puede variar de un 5-10% a un 25% según si la cubierta es sembrada o si es espontánea. El número de sarmientos por vid no se suele ver afectado por los tratamientos, ya que suele depender de la poda (Ibáñez, S. et al, 2009).

Uno de los parámetros de la calidad del vino más importantes en la uva es la concentración de azúcares que tiene, por una parte, por su conversión en etanol tras la fermentación, y por otra parte reduciendo el sabor amargo o astringente que pueda tener el vino o mosto. La relación entre la cantidad de azúcares en la baya y vinos, o el aumento de la graduación en vinos, y el estrés hídrico y la reducción del rendimiento en los parámetros está muy documentada (White, 2003; Lopes et al, 2011).

Otro de los factores que afectan a la calidad del vino es la acidez. No solo afecta a sus propiedades organolépticas, también afecta a las características químicas y biológicas de los componentes del vino, que pueden afectar a su vez a elementos tan importantes como el color. Los principales componentes de la acidez de la baya, de los mostos y vinos son los ácidos orgánicos: ácido tartárico/tartrato y el ácido málico/malato, pero otro componente que afecta a la acidez es el ion potasio. En la bibliografía se puede observar que se pierde acidez en viñedos con cubiertas vegetales, no por menor producción de los ácidos orgánicos, sino por el aumento del potasio, que precipita en forma de sales del ácido tartárico (Ibáñez, S. et al, 2009).

Las antocianinas y los polifenoles son los otros componentes de la calidad del vino. El aumento de polifenoles y antocianos se puede relacionar con una reducción del tamaño de las bayas y con el tratamiento de las cubiertas verdes (Ibáñez, S. et al, 2009).

### **3. Microbiología del suelo**

La microbiología del suelo es muy compleja por la enorme variedad de familias de microorganismos que pueden estar presentes en él, desde patógenos de plantas, hasta microorganismos beneficiosos, tales como los fijadores del nitrógeno atmosférico. Desde el punto de vista agronómico es deseable poder pronosticar la dinámica de poblaciones de la microbiota asociada al suelo de un determinado cultivo.

Identificar poblaciones y estudiarlas "in situ" es difícil y hasta la fecha se tiene una comprensión limitada de la complejidad del ensamblaje de las distintas comunidades de microorganismos en los suelos. (Paul, E. A.; 2007).

Se ha estimado que en un suelo fértil, habrá más organismos individuales que la cantidad total de seres humanos que hayan existido:  $10^{12}$  bacterias,  $10^4$  protozoos,  $10^4$  nematodos y un sin número de otras especies (Young, I. M. y Crawford, J. W., 2004).

Los microorganismos beneficiosos ayudan a las raíces de las plantas a absorber nutrientes, a incorporarlos al ecosistema a partir de las reservas atmosféricas o minerales, a descomponer los desechos, a liberar elementos minerales en forma soluble y a proteger las raíces de los patógenos. También mantienen los agregados del suelo juntos, creando canales a través de los cuales crecen las raíces, los animales del suelo se mueven y el agua se filtra.

Sin embargo, las prácticas agrícolas tradicionales, como la labranza, modifican afectan a las comunidades microbianas del suelo. Aunque reduce temporalmente la compactación del suelo, la labranza convencional promueve la pérdida de materia orgánica (Feng Y. et al, 2003). Por otro lado, Tognetti y col. (2005) encontraron que los abonos orgánicos aumentaban la actividad y el tamaño de la población microbiana, y la capacidad de degradación del material orgánico del suelo.

### 3.1. Factores que influyen en la microbiota del suelo

Se cree que las interacciones competitivas son un factor clave que controla la estructura y la diversidad de la comunidad microbiana. Las relaciones microbianas a menudo se producen en microhábitats, un hábitat muy localizado y a una escala muy pequeña, a menudo microscópica. Muy a menudo, en suelos fertilizados, los microorganismos viven en micro-agregados de suelos, en los poros del suelo. El suelo con partículas pequeñas suele mostrar una alta diversidad microbiana, mientras que la diversidad del suelo con partículas más grandes suele ser menor (Torsvik, V., Øvreås, L., 2002) y esto puede deberse a la mayor disponibilidad de agua y sustrato, la difusión del gas y la protección contra la depredación que ofrecen las partículas pequeñas.

Las áreas cercanas a la superficie del suelo pueden enriquecerse con materia orgánica en descomposición y otros nutrientes, mientras que el subsuelo es más pobre en nutrientes; el microambiente del suelo en algunos poros puede ser altamente ácida, otros más básica, dependiendo de la mineralogía del suelo y la actividad biológica. Los contenidos de temperatura y agua del suelo superficial pueden variar ampliamente de los de los subsuelos (Torsvik, V., Øvreås, L., 2002).

Los microorganismos del suelo del viñedo se ven afectados por la región vitícola, el clima y la topografía, y más directamente por propiedades del suelo tales como el pH y los depósitos de materia orgánica que pueda contener (Burns et al., 2015). Las prácticas de gestión de viñedos alteran el entorno del suelo y, por lo tanto, contribuyen a dar forma a la comunidad microbiana. Estos incluyen: uso de cultivos de cobertura, labranza y aplicación de compost (Burns et al., 2016).

Las plantas alteran las propiedades del suelo, la agregación del suelo y el estado de los nutrientes del suelo, a través de exudación de la raíz. A su vez, esto afecta el microambiente del suelo, dando como resultado cambios en la comunidad microbiana del suelo.

El uso de la labranza también altera la distribución de la materia orgánica del suelo y la estructura del suelo, provocando cambios en el tamaño, la composición y la estabilidad del agregado y la disponibilidad variable de nutrientes del suelo. Las enmiendas de compost agregan carbono y nitrógeno lábiles, nutrientes y comunidades microbianas activas al suelo.

Las comunidades bacterianas y fúngicas se ven afectadas por la altitud, que actúa como un gradiente fisicoquímico complejo. La humedad del suelo, el contenido de aluminio, magnesio, manganeso y arcilla cambian con la altitud e influyen en la estructura de la comunidad bacteriana, y en el caso de los hongos, la humedad del suelo, el contenido de boro y arcilla son los principales impulsores de la comunidad (Corneo, P. E. et al, 2013).

### 3.2. Familias de microorganismos relevantes para los suelos de viñedo

Las comunidades de los microorganismos pueden variar mucho, incluso dentro de un mismo viñedo. Dichas comunidades se distribuyen aleatoriamente, independientemente de si el suelo pertenece a la hilera de las vides o al camino. Se piensa que la distribución aleatoria interviene la dispersión de los microorganismos por el viento. La dispersión por el viento no solo distribuiría a las comunidades de hongos mediante esporas, también distribuiría a las comunidades de bacterias al mover partículas de suelo con ellos dentro (Likar, M., et al, 2017).

Los *actinomicetos* son bacterias filiformes parecidos a hongos. Aunque no son numerosos, desempeñan papeles vitales en el suelo. Es un microorganismo que ayuda a descomponer la materia orgánica en humus, liberando nutrientes. También producen antibióticos para combatir a los competidores. Muchos de estos mismos antibióticos se usan para tratar enfermedades humanas. Los actinomicetos son responsables del olor dulce y terroso que se nota cuando se cultiva un suelo biológicamente activo (Jhonson, C. 2009).

Las *levaduras* son un grupo dentro de los hongos compuesto por 350 especies y 39 géneros. La mayoría de las levaduras son unicelulares. Normalmente se encuentran en la naturaleza en el suelo, en ambientes acuáticos, en el néctar de las flores y en la superficie de la fruta.

La mayoría son saprófitas y proliferan en materia orgánica en descomposición, mientras que otros son parásitos. Morfológicamente, las levaduras se consideran microorganismos grandes, al menos al compararlos con bacterias, ya que tienen en general forma ovoide de 1-5  $\mu\text{m}$  de ancho, 5-30  $\mu\text{m}$  de largo y 3-8  $\mu\text{m}$  de diámetro (Schlegel, H. G., Zaborosch, C., 1997).

Las levaduras son células eucariotas, es decir, con núcleo y con estructuras intracelulares como mitocondrias, retículo endoplasmático y aparato de Golgi. La mayoría de las levaduras se reproduce por gemación, es decir, de forma asexual. Las levaduras son microorganismos aerobios, algunas de forma estricta y otras de forma facultativa. Como los mohos, crecen mejor en ambiente ácido (pH de 3,8-5,6) toleran un rango amplio de pH, de 2 a 8. La mayoría de las levaduras crecen con una temperatura óptima de 22-30 °C, pero toleran temperaturas comprendidas entre 0-50 °C.

Las características de las levaduras del viñedo que quedan asociadas a la superficie del hollejo de las uvas son, evidentemente, de suma importancia para el proceso de la fermentación alcohólica que se realizará posteriormente en la bodega.

Las *bacterias fijadoras de nitrógeno* son un grupo de microorganismos capaces de romper los triples enlaces del nitrógeno atmosférico y utilizarlo en su metabolismo en forma de ion amonio. Aunque se sabe que la mayor parte de esta actividad se produce en los nódulos de las raíces de las leguminosas (100-300 Kg de nitrógeno/hectárea cada año), también hay organismos fijadores de nitrógeno libres en el suelo (1-3 Kg de nitrógeno/hectárea y año). La capacidad de fijar nitrógeno está muy extendida entre las bacterias del suelo y de las aguas, en especial a las que están dentro de los grupos de procariotas fototróficos, las bacterias rojas del azufre y sin azufre, así como las cianobacterias. La investigación de estas bacterias se hace por comprobación del crecimiento, aunque en las últimas décadas se ha facilitado mucho gracias a las técnicas de marcación isotópicas con nitrógeno 15, un isótopo minoritario del nitrógeno atmosférico, y mediante cromatografía de gases y la determinación de etileno a partir de acetileno que realizan las bacterias fijadoras.

Para producir la reacción es necesario tener una atmósfera con valores bajos de oxígeno, molibdeno y níquel. El molibdeno es necesario como fijador del nitrógeno, y el níquel como cofactor de la hidrogenasa.

Los *microorganismos aerobios* totales del suelo son un grupo que incluye a todos los microorganismos del suelo que son capaces de crecer en presencia de oxígeno. Los que utilizan el oxígeno son aerobios estrictos, y los que no lo utilizan, pero crecen en su presencia son anaerobios aerotolerantes (Stanier, R. Y., 1992). Un tercer grupo, que necesita oxígeno, pero a una concentración inferior a la atmosférica, es llamado microaerobio. Como la característica de crecer en presencia de oxígeno es extremadamente habitual en microbiología, y no un rasgo distintivo, no se utiliza por si solo para describir a un grupo de microorganismos, ni suele ser el único rasgo de selección a la hora de hacer un cultivo de selección. Se hacen recuentos de aerobios totales en los laboratorios de microbiología, no para diferenciarlos de microorganismos anaerobios o microaerobios, sino para hacer un recuento de los microorganismos en un suelo, agua o alimento.

## OBJETIVOS

Los objetivos propuestos para este Trabajo Fin de Máster fueron los siguientes:

1. Estudiar cinco subparcelas de cultivo de viñedo ecológico localizadas en una finca de la D.O.Ca. Rioja, con distintas características y manejo de cultivo:

a) Subparcela degradada y recuperada con un tratamiento de abono orgánico.

b) Dos subparcelas degradadas y recuperadas con cubiertas vegetales de cereal-leguminosa, y tratamiento de segado y abono en verde.

c) Subparcela control no degradada y con la misma localización geográfica.

d) Subparcela control degradada, sin tratamiento de recuperación con la misma localización geográfica.

2. Realizar análisis microbiológicos de los suelos de las parcelas mediante el cultivo en medios selectivos para las siguientes familias de microorganismos:

a) Microorganismos fijadores de nitrógeno

b) Actinomicetos, descomponedores de materia orgánica

c) Aerobios totales

d) Levaduras

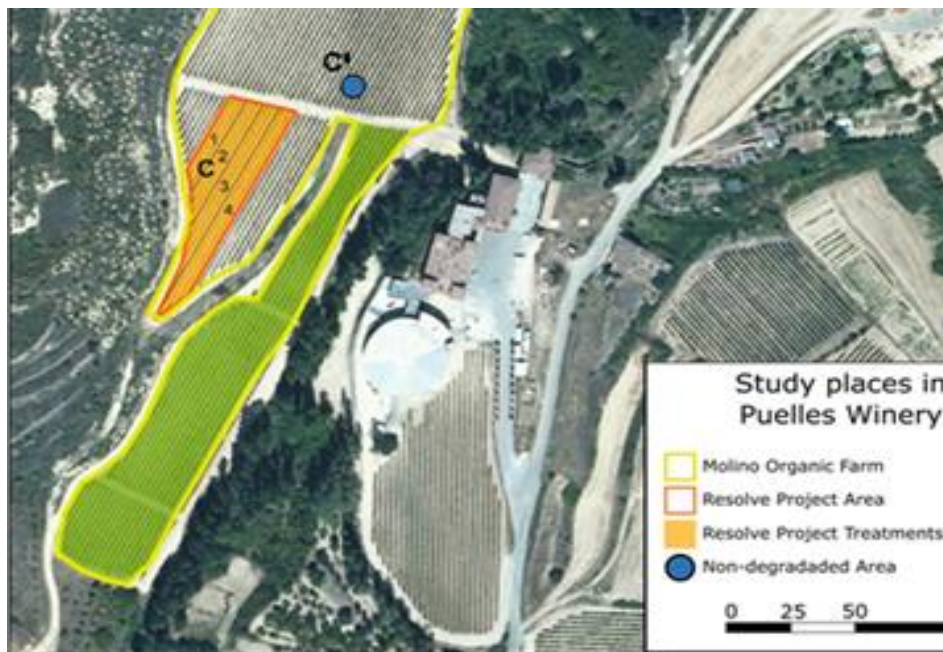
3. Estudiar y cuantificar la producción y calidad de la uva de las distintas parcelas de viñedo estudiadas.

4. Buscar posibles relaciones entre la microbiota del suelo, los tratamientos de recuperación del viñedo degradado y la producción y calidad de la uva.

## MATERIALES Y MÉTODOS

### 1. Localización de la parcela

Para la realización de este trabajo se muestrearon suelos de los viñedos de cultivo ecológico de la finca El Molino de bodegas Puelles (Ábalos, La Rioja, España).



**Figura 1.-** Zona de estudio (letra C), tratamientos (números) y zona no degradada (punto azul C') en la Finca El Molino de Bodegas Puelles (Ábalos, La Rioja). La zona C había sido calificada por el enólogo de la bodega como suelo degradado, y la zona C' como suelo no degradado. Las subparcelas se indican con números 1-4.

### 2. Tratamientos aplicados en el viñedo

En este viñedo se había realizado en el año 2015 un estudio edafológico y se clasificó una zona (C) como degradada en función del bajo desarrollo de las vides y su baja producción de uva. En los años sucesivos 2016 y 2017 se implementaron tres tipos diferentes de tratamientos. Cada tratamiento abarcó cuatro filas de cepas y sus tres calles interiores. El tratamiento se aplicó en la calle central, sirviendo las otras dos como borde o amortiguamiento entre tratamientos.



El primero de ellos, denominado como “EE” y representado con el número 2 en la Figura 1, consistió en añadir estiércol en una cantidad de 40 Tn/ha. El segundo tratamiento, etiquetado como “CH” y que se puede observar en la Figura 1 con el número 3, se basó en la siembra de cebada (20 kg/ha) y haba (40 kg/ha). El último tratamiento, marcado como “AA” y con el número 4 en la Figura 1, se basó en la siembra de avena (10 kg/ha) y alfalfa (10 kg/ha). El objetivo de estas cubiertas era utilizarlas como abono en verde, segando y dejándolas en el suelo como cubierta seca ("dry mulching") para proteger el suelo frente a la erosión y que a su vez aportara nutrientes al suelo de forma natural. Ambas cubiertas vegetales se dejaron crecer de forma espontánea. El primer corte de las cubiertas se realizó en junio de 2017 y se dejaron incorporadas a los suelos como cubierta seca. En el mes de julio fue necesario un segundo corte de la cubierta de la parcela AA debido a que la alfalfa había rebrotado a consecuencia de las precipitaciones caídas en el mes anterior, y ya no fueron necesarias más siegas. En el mes de octubre se realizó la vendimia de forma manual.

Para este TFM en la época de poda se muestrearon los suelos de las tres parcelas recuperadas, y además dos suelos que se tomaron como controles. En el primer control, señalado como un punto azul en la Figura 1 y denominado como “NOD” (no degradado), no se realizó ningún tratamiento ni ninguna labranza sobre esa parcela. El segundo control, llamado “CON” (control) y señalado en la Figura 1 con el número 1 de la zona naranja, no tuvo ningún tratamiento específico y se realizó sobre él una labranza tradicional.

### 3. Recogida de las muestras de suelos

Para cada una de las cinco parcelas estudiadas se tomaron las muestras de suelo con 5 repeticiones como se indica más adelante. Dentro de cada parcela (marcadas en la Figura 1) se eligió una cepa al azar, teniendo cuidado de dejar la calle de amortiguamiento a cada lado como se ha explicado anteriormente, y se colocó una estaca en ese punto, junto a la cepa, rotulando la parcela correspondiente (NOD, CON, EE, CH, AA) y el número (1 a 5) de la repetición.



**Figura 2.1.-** Cepa seleccionada, calle y papel informativo para el tratamiento NOD (27-2-2018)



**Figura 2.2.-** Cepa seleccionada, calle y papel informativo para el tratamiento CON (27-2-2018)



**Figura 2.3.-** Cepa seleccionada, calle y papel informativo para el tratamiento EE (27-2-2018)



**Figura 2.4.-** Cepa seleccionada, calle y papel informativo para el tratamiento CH (27-2-2018)



**Figura 2.5.-** Cepa seleccionada, calle y papel informativo para el tratamiento AA (27-2-2018)

Se tomó una muestra de 100 g de suelo superficial a 60 cm hacia el interior de la calle de la cepa elegida empleando para ello recipientes estériles. Para que el muestreo fuese representativo, se recogió suelo de otros tres puntos, próximos a cepas alternas en zig-zag dentro de la misma calle, mezclando las cuatro muestras obtenidas en una bolsa estanca con cierre zip. La muestra fue debidamente etiquetada con el código correspondiente, congelada a -80 °C y mantenida a esa temperatura hasta el momento de su análisis microbiológico. El esquema seguido fue el siguiente:

**VID 1** VID 2 **VID 3** VID 4 VID 5 VID6 VID 7 VID 8 VID 9 VID10

VID 1 **VID 2** VID 3 **VID 4** VID 5 VID6 VID 7 VID 8 VID 9 VID10

Donde la **VID1** es la cepa elegida al azar. El resto del suelo de la bolsa con zip se guardó a 4 °C para posibles análisis químicos adicionales.

#### 4. Técnicas analíticas

##### 4.1. Determinaciones agronómicas

El día de la vendimia, se determinó visualmente el nº racimos y el nº de pámpanos de cada vid. La producción se obtuvo pesando todos los racimos de una misma vid. Para cada tratamiento había tres calles de cepas y se tomaron 5 muestras de la calle central.

La fertilidad se calculó dividiendo el nº de racimos entre el nº de pámpanos. El peso medio del racimo se calculó dividiendo la producción entre el nº de racimos. Finalmente, se tomó una muestra de 100 bayas del total de racimos de cada cepa para determinar su peso.

##### 4.2. Análisis de cuantificación los compuestos fenólicos y de antocianinas

Para preparar la muestra, se seleccionaron 50 bayas representativas, se pesaron a la vez y se calculó el peso medio de cada baya. Se homogeneizó primero mediante trituración con un homogenizador (Ultra turrax grinder mixer, de IKA Staufen, Alemania) a 24000 rpm durante 30 segundos, y después durante otros 15 segundos tras coger los residuos de la máquina.

Se mezcló mediante agitación y se pesó 1 gramo de la muestra en un tubo de centrífuga. El error en la pesada no fue superior a los 0,02 g y se anotó el peso real pesado.

Para la extracción, se añadieron a la muestra en el tubo de centrífuga 10 ml de una disolución de etanol al 50% en agua y ajustado a pH 2 con HCl 1M. Se sonicó cada 5-10 minutos durante una hora, y se centrifugó (Heraeus Megafuge 16R Centrifuge) a 1375 RCF durante cinco minutos. Una vez centrifugado se recogió 1 ml del sobrenadante, se diluyó en 10 ml de HCl 1M y se homogeneizó.

A las 3 h se midió en un espectrofotómetro UV-VIs (DR 5000, Hach Lange, Germany) a tres longitudes de onda diferentes (280, 520 y 700 nm) siguiendo el método descrito por Iland et al, (2004). A 280 nm se determina la absorbancia de los fenoles totales, y a 520 nm la intensidad de la coloración roja debida a las antocianinas.

#### 4.3. Determinación del grado Brix

Los grados Brix se determinaron empleando un refractómetro digital con compensador de temperatura y de pH (Atago, Tokio, Japón) según el método de la OIV (2009). Éste consiste en recoger unos mililitros de las muestras homogeneizadas durante el análisis de los fenoles y antocianinas, y se colocaron en la lente del refractómetro realizando una medida directa.

#### 4.4. Técnicas estadísticas (ANOVA)

El tratamiento estadístico se realizó sobre los componentes de producción de las cepas ( $n^{\circ}$  de racimos/cepa,  $n^{\circ}$  de pámpanos/cepa, fertilidad, peso racimo, producción/cepa y peso de 100 bayas) y sobre los parámetros bioquímicos determinados para las bayas (sólidos solubles totales, pH, compuestos fenólicos y contenido en antocianinas).

Se utilizó el programa estadístico Infostat (versión libre 2008 para Windows, del grupo Infostat, FCA, Universidad Nacional de Córdoba, Argentina), y se aplicó el test post-hoc Tukey con un nivel de confianza superior al 95 % ( $p < 0,05$ ) para determinar la homogeneidad de varianzas y diferencias significativas entre las muestras.



## 5. Análisis microbiológico de las muestras de suelo

### 5.1. Medios de cultivo

Para el análisis microbiológico de las muestras de suelos se utilizaron 4 medios de cultivo diferentes. En la Tabla 1 se muestran tanto los distintos microorganismos que pueden crecer en ellos, así como la composición de los mismos.

**Tabla 1.-** Composición de los medios de cultivo.

Medio de cultivo	Antibiótico adicionado para la inhibición de otros microorganismos	Composición para 1 litro	Microorganismos seleccionados
Yeast Peptone Dextrose (YPD-agar)	Penicilina (50µg/ml) 1 ml Estreptomicina (100µg/ml) 1 ml	Extracto de levadura 10g Glucosa 20g Peptona 20g Agar 20g	Levaduras
Plate Count Agar (PCA)	Nistatina (200µg/ml) 1 ml	Plate count agar 22g Glicerol 5g	Aerobios totales
Bacto Actinomycete Isolation- agar (Acti)	Nistatina (200µg/ml) 1 ml	Actinomycetes isolation agar 23,5g Glicerol 5g	Actinomicetos (descomponedo- res de materia orgánica)
Medio de Burk	Nistatina (200µg/ml) 1 ml	K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> 0,8g KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> 0,2g MgSO <sub>4</sub> *7H <sub>2</sub> O 0,2g NaCl 0,2g CaSO <sub>4</sub> 0,1g Sacarosa 20g Mezcla Fe- Mo <sup>^</sup> 1ml H <sub>3</sub> BO <sub>3</sub> (10mg/10ml) 0,1ml ZnSO <sub>4</sub> *7H <sub>2</sub> O (10mg/10ml) 0,1ml MnSO <sub>4</sub> *4H <sub>2</sub> O (10mg/10ml) 10µl CuSO <sub>4</sub> *5H <sub>2</sub> O (3mg/10ml) 10µl KI (1mg/10ml) 10µl Agar 20g	Bacterias fijadoras de nitrógeno

<sup>^</sup> La mezcla Fe-Mo se realiza añadiendo 1,45 g de FeCl<sub>3</sub>\*6H<sub>2</sub>O y 0,253 g de Na<sub>2</sub>MoO<sub>4</sub>\*2H<sub>2</sub>O en 100 ml de agua destilada.

Los productos empleados para la preparación de estos medios fueron: extracto de levadura (Yeast extract, BD Becton and Dickinson Co., Francia), peptona (BD Becton and Dickinson Co), glucosa (Acros organics, Francia), Plate Count Agar (Difco™ BD Becton and Dickinson Co), Actinomycete isolation agar (BD Becton and Dickinson Co), nistatina (Acofarma, Terrasa, Barcelona, España), glicerol (Difco™ BD Becton and Dickinson Co.), agar (BD Becton and Dickinson Co), penicilina (Sigma-Aldrich Química, Madrid, España), estreptomycin (Sigma-Aldrich Química), y todas las sales indicadas en la Tabla 1, de Sigma-Aldrich-Química.

Una vez preparados, los medios de cultivo se esterilizaron a 121 °C durante 20 minutos en el autoclave. Los antibióticos se añadieron después de la esterilización, cuando la temperatura del medio era aproximadamente 56 °C, para evitar su inactivación.

## 5.2. Preparación de las muestras

Para cada muestra, se pesaron 10 gramos de suelo en un recipiente estéril, se transvasaron a un bote con 95 mL de solución salina estéril (NaCl 0.9%) y se mantuvieron en agitación durante una hora a 130 rpm y a Tª ambiente.

Pasado este tiempo, se recogieron 500 µl y se añadieron a un tubo con 4,5 ml de solución salina estéril al 0,9% para obtener una dilución 1/10. Este proceso se repitió 3 veces más para obtener diluciones 1/10<sup>2</sup>, 1/10<sup>3</sup>, y 1/10<sup>4</sup>.

Se realizaron las siguientes siembras (según el medio de cultivo):

- YPD: Directo, 10, 10<sup>2</sup>
- Acti: 10, 10<sup>2</sup>, 10<sup>3</sup>
- Burk: 10<sup>2</sup>, 10<sup>3</sup>, 10<sup>4</sup>
- PCA: 10<sup>2</sup>, 10<sup>3</sup>, 10<sup>4</sup>

Se sembraron 50 µl de la dilución correspondiente y se extendieron con un asa de siembra por toda la placa. Se añadieron cristales de bifenilo a la tapa de cada placa Petri, para impedir el crecimiento de hongos. Se introdujeron en una estufa a 25-30 °C y se realizaron recuentos de las colonias a las 48 y 72 h. Para las placas de YPD se dejaron hasta 6 días para comprobar el crecimiento de las levaduras.

Por otro lado, para la determinación del peso seco se pesaron otros 10 g de suelo húmedo en un recipiente estéril y se introdujeron en un horno a 60 °C durante 24 h. Transcurrido el tiempo, se volvió a pesar la muestra obteniendo así su peso seco.

### 5.3. Tinción de Gram

La tinción de Gram es un tipo de tinción diferencial empleado en bacteriología para la visualización de bacterias. Se utiliza tanto para poder referirse a la morfología celular bacteriana, como para poder realizar una primera aproximación a la diferenciación bacteriana, considerándose bacterias Gram+ a las que se visualizan de color morado, y bacterias Gram- a las que se visualizan de color rosa.

El procedimiento llevado a cabo fue el siguiente:

1. Preparar frotis y fijar (Dejar secar a temperatura ambiente o utilizando un mechero).
2. Agregar cristal violeta y esperar un minuto.
3. Lavar con agua.
4. Agregar lugol y esperar un minuto aproximadamente.
5. Lavar con agua.
6. Agregar alcohol acetona hasta que no se decolore más, entre 5 y 30 segundos según la concentración del reactivo.
7. Lavar con agua.
8. Agregar safranina y esperar un minuto.
9. Lavar con agua.
10. Dejar secar
11. Observar al microscopio. Si se quiere observar a 100 aumentos, es necesario utilizar aceite de inmersión.

## 6. Datos de Meteorología

Los datos de temperatura mínima, máxima y media (°C), humedad relativa media (%), pluviometría (l/m<sup>2</sup>), y radiación media (W/m<sup>2</sup>) se recogieron de la página web: <http://www.larioja.org/agricultura/es/informacion-agroclimatica/consulta-personalizada>.

## RESULTADOS Y DISCUSIÓN

### 1. Resultados de los análisis microbiológicos de los suelos

La tabla 2 muestra los resultados obtenidos en los recuentos de microorganismos de los cinco suelos para determinar la población viable de: levaduras (medio YPD), actinomicetos (medio ACTI), fijadores de nitrógeno (medio Burk) y aerobios totales (medio PCA). Asimismo, se muestran los resultados del análisis ANOVA. Como puede verse, no hay diferencias significativas entre las parcelas para cada una de las familias de microorganismos.

Tabla 2.- Población de las distintas familias microbianas en los suelos de cada una de las parcelas estudiadas

	YPD (log(UFC/g PS))	ACTI (log(UFC/g PS))	BURK (log(UFC/g PS))	PCA (log(UFC/g PS))
NOD	4,97±0,11 a	6,67±0,07 a	7,07±0,13 a	6,92±0,17 a
CON	4,60±0,33 a	6,72±0,15 a	7,20±0,21 a	6,95±0,14 a
EE	4,76±0,32 a	6,89±0,14 a	7,27±0,24 a	6,97±0,23 a
CH	4,80±0,10 a	6,78±0,07 a	7,17±0,12 a	6,86±0,12 a
AA	4,58±0,27 a	6,84±0,15 a	7,27±0,08 a	6,84±0,08 a

Letras iguales indican que no hay diferencias estadísticamente significativas entre los valores (ANOVA entre valores de una misma familia de microorganismos para las distintas parcelas de viñedo).

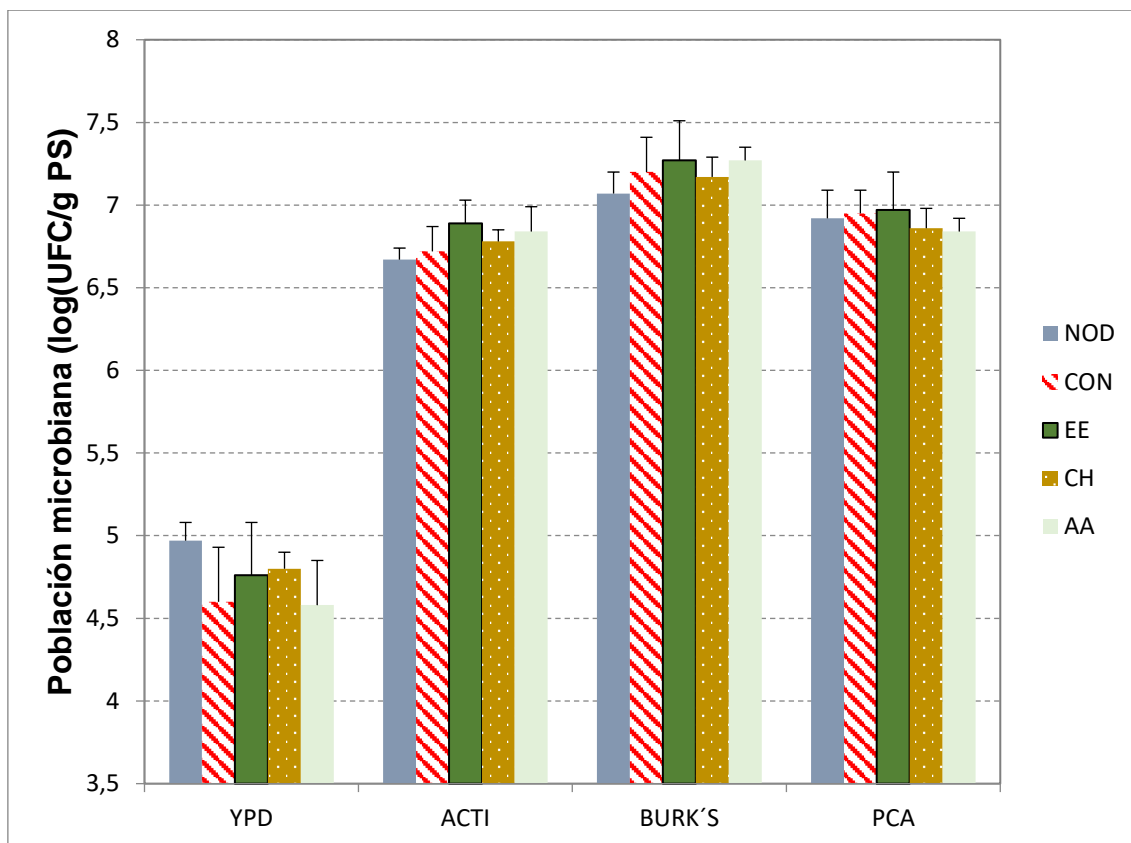
YPD: levaduras. ACTI: actinomicetos, descomponedores de materia orgánica. BURK: fijadores de nitrógeno. PCA: microorganismos aerobios totales.

NOD: parcela no degradada. CON: parcela control degradada. EE: parcela recuperada con estiércol. CH: parcela con cubierta vegetal de cebada y haba. AA: parcela con cubierta vegetal de avena y alfalfa.

UFC/g PS: unidades formadoras de colonias por gramo de peso seco de tierra.

En la Figura 3 se muestran los resultados de poblaciones microbianas del suelo para cada uno de los tratamientos de recuperación y para los controles.





**Figura 3.** Población microbiana del suelo de cada una de las parcelas estudiadas. YPD: levaduras. ACTI: actinomicetos, descomponedores de materia orgánica. BURK: fijadores de nitrógeno. PCA: microorganismos aerobios totales. NOD: parcela no degradada. CON: parcela control degradada. EE: parcela recuperada con estiércol. CH: parcela con cubierta vegetal de cebada y haba. AA: parcela con cubierta vegetal de avena y alfalfa.

Puede observarse que, en las poblaciones bacterianas de microorganismos fijadores de nitrógeno, descomponedores y aerobios, la parcela recuperada con abono de estiércol alcanza valores ligeramente más elevados respecto a las otras parcelas. Este resultado concuerda con los de otros estudios que comparan sistemas convencionales de abonado con el abono orgánico y que indican una mayor abundancia de microorganismos beneficiosos para la producción y el equilibrio del suelo con el abono orgánico (Lupatini *et al.*, 2017).

Respecto a las poblaciones de levaduras, son en todos los casos inferiores a las de bacterias, como cabría esperar al ser una familia de microorganismos eucariotas que abarca un menor número de especies que las otras familias, y como en otros estudios similares (Corneo *et al.*, 2013).

Por otro lado, es notable que la población de levaduras viables que cuantificamos durante la época de poda (invierno) es aún cuantiosa (más de  $10^4$  UFC/g PS) teniendo en cuenta que la vendimia se había realizado en otoño cuando restos de uvas quedan en el suelo y aportan la microbiota asociada a la superficie del hollejo. Estos resultados están en concordancia con el hecho de que las comunidades microbianas del suelo se estructuran conforme a las prácticas agronómicas que se llevan a cabo (Burns *et al.*, 2016) y demuestran que el suelo del viñedo es un importante reservorio de levaduras, microorganismos fundamentales para el desarrollo posterior en bodega de la fermentación alcohólica, tanto para que se lleve a cabo de manera favorable, como para que se desarrolle de manera no deseada por la presencia de levaduras alterantes (Belda *et al.*, 2017).

## 2. Resultados de la producción y calidad de la uva

Los datos de rendimiento y producción de la vid obtenidos para los diferentes suelos se muestran en la tabla 3, junto con los resultados del análisis ANOVA, así como en las Figuras 3.1-3.6.

Tabla 3.- Resultados del rendimiento y producción de la vid en cada una de las parcelas estudiadas.

	Nº de pámpanos	Nº de racimos	Fertilidad	Peso Racimo (g)	Producción (Kg)	Peso 100 bayas (g)
NOD	10,20±2,49 a	3,40±2,07 a	0,36±0,23 a	218,40±137,20 a	0,81±0,83 a	200,82±24,99 a
CON	9,00±2,83 a	7,80±3,70 ab	0,87±0,35 ab	298,70±57,31 a	2,22±0,96 ab	231,43±13,61 ab
EE	10,60±1,52 a	9,80±2,49 b	0,95±0,30 b	267,56±62,41 a	2,51±0,26 b	231,60±14,92 ab
CH	9,60±2,19 a	7,80±1,92 ab	0,84±0,27 ab	223,97±34,07 a	1,78±0,62 ab	208,25±20,24 ab
AA	9,80±0,84 a	6,20±2,59 ab	0,62±0,21 ab	274,80±118,39 a	1,79±1,06 ab	236,18±15,98 b

Letras distintas indican que hay diferencias estadísticamente significativas entre los valores

NOD: parcela no degradada. CON: parcela control degradada. EE: parcela recuperada con estiércol. CH: parcela con cubierta vegetal de cebada y haba. AA: parcela con cubierta vegetal de avena y alfalfa.

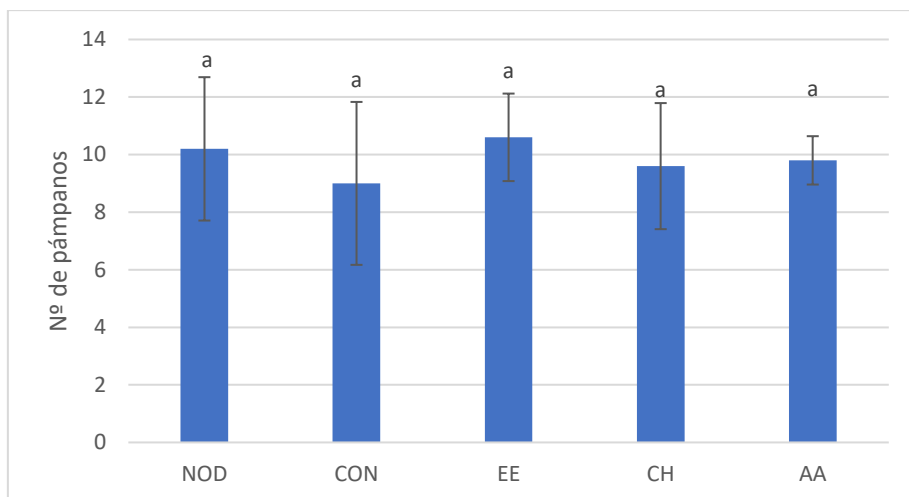


Figura 4.1.- Número medio de pámpanos por cepa. NOD: parcela no degradada. CON: parcela control degradada. EE: parcela recuperada con estiércol. CH: parcela con cubierta vegetal de cebada y haba. AA: parcela con cubierta vegetal de avena y alfalfa.

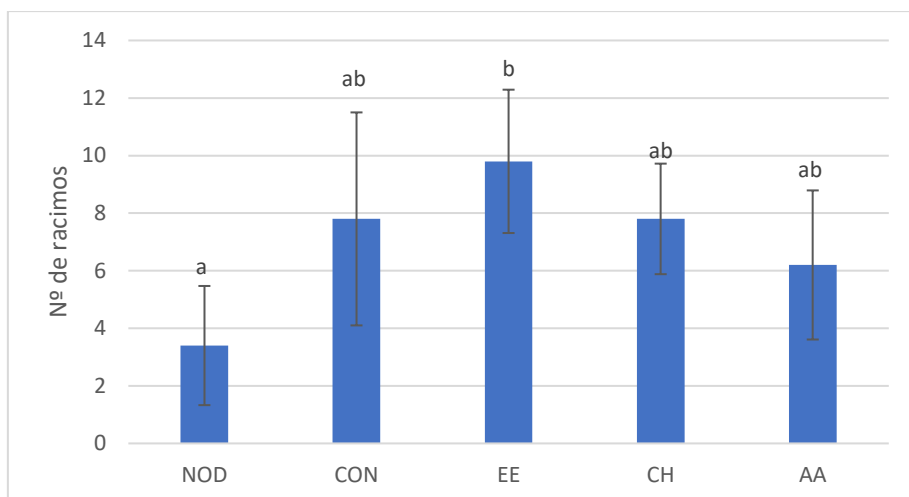


Figura 4.2.- Número medio de racimos por cepa. NOD: parcela no degradada. CON: parcela control degradada. EE: parcela recuperada con estiércol. CH: parcela con cubierta vegetal de cebada y haba. AA: parcela con cubierta vegetal de avena y alfalfa.

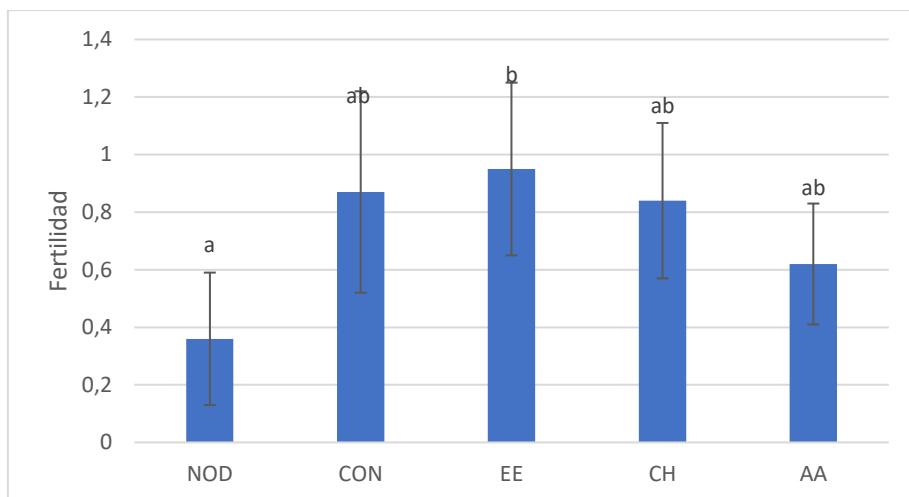


Figura 4.3.- Fertilidad media por cepa. NOD: parcela no degradada. CON: parcela control degradada. EE: parcela recuperada con estiércol. CH: parcela con cubierta vegetal de cebada y haba. AA: parcela con cubierta vegetal de avena y alfalfa.

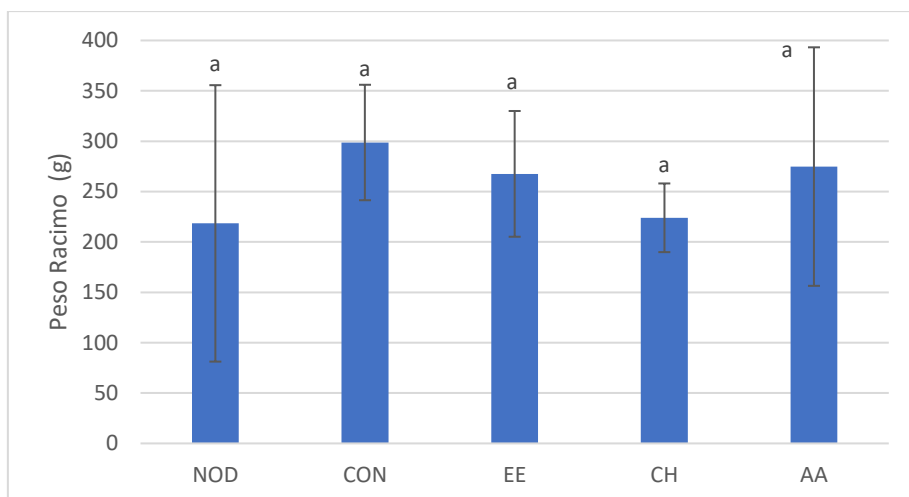


Figura 4.4.- Peso medio por racimo. NOD: parcela no degradada. CON: parcela control degradada. EE: parcela recuperada con estiércol. CH: parcela con cubierta vegetal de cebada y haba. AA: parcela con cubierta vegetal de avena y alfalfa.

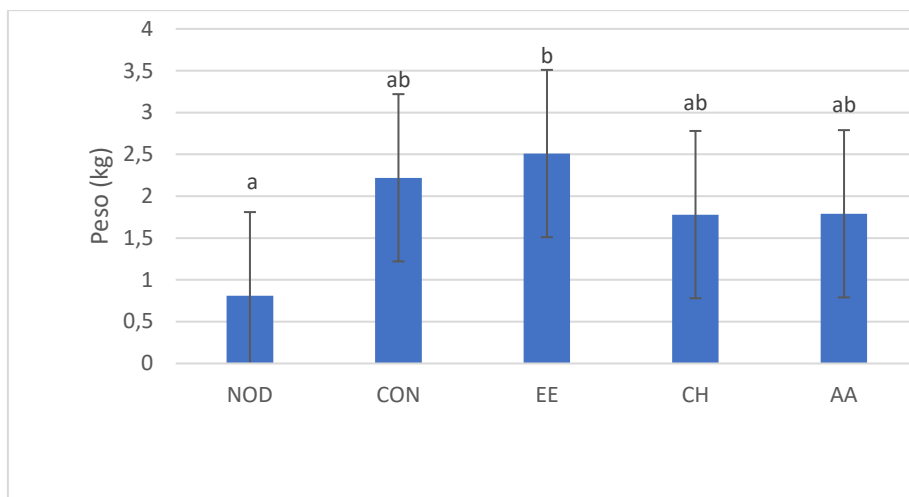


Figura 4.5.- Producción media cepa. NOD: parcela no degradada. CON: parcela control degradada. EE: parcela recuperada con estiércol. CH: parcela con cubierta vegetal de cebada y haba. AA: parcela con cubierta vegetal de avena y alfalfa.

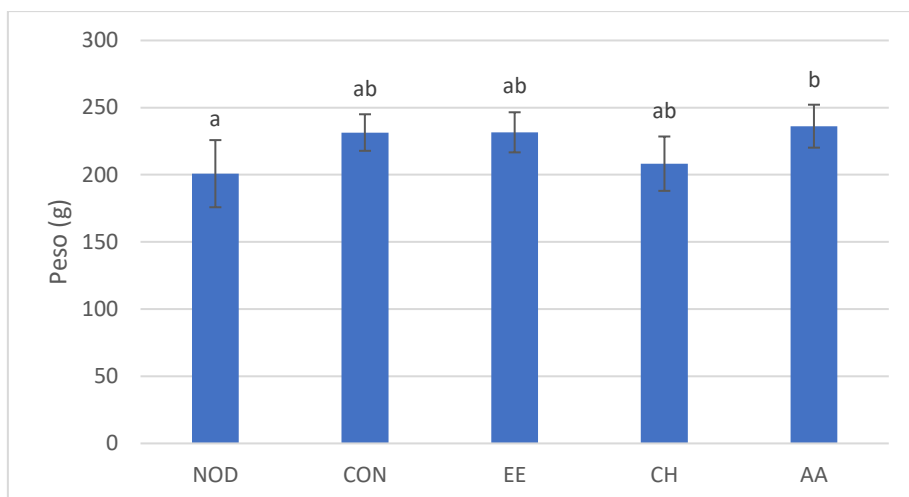


Figura 4.6.- Peso medio de 100 bayas. NOD: parcela no degradada. CON: parcela control degradada. EE: parcela recuperada con estiércol. CH: parcela con cubierta vegetal de cebada y haba. AA: parcela con cubierta vegetal de avena y alfalfa.

Se puede observar que en el nº de pámpanos y el peso de los racimos no hay diferencias significativas entre las parcelas. Sin embargo, en el número de racimos, en la fertilidad, en la producción y en el peso de 100 bayas hay en todos los casos diferencias significativas entre la producción de la parcela recuperada con abono de estiércol (EE) y la parcela control NOD sin ningún tipo de tratamiento, y en todos los casos la producción de la parcela abonada con estiércol alcanza los valores más elevados.

Este resultado se correlaciona con la máxima población microbiana obtenida precisamente en el suelo de esta parcela, tal y como se ha mostrado en la tabla 2. Estos resultados demuestran que la materia orgánica favorece el crecimiento de la microbiota del suelo y a su vez aumenta el vigor de la vid y su producción de uva (White, 2015). Si comparamos estos resultados con los del trabajo de Martínez *et al.* (2014) se puede considerar que la producción de la parcela control CON es normal y que la parcela EE presenta valores altos de producción, mientras que en las restantes parcelas los valores de producción han resultado más bajas. Así, el peso medio del racimo y la fertilidad que hemos obtenido han resultado ser mucho menores que los obtenidos por Martínez *et al.*, en algunos casos menos de la mitad (NOD, CON, AA y CH para el número de racimos, y NOD y AA para la fertilidad), pero el peso de 100 bayas y en el peso de racimo han resultado ser más elevados, en algunos tratamientos más del doble (CON para peso de racimo). El número de pámpanos fueron altos al comparar con el estudio de Manzanos *et al.* (2013).

Los datos del análisis químico de la uva producida en las parcelas con los diferentes tratamientos se muestran en la tabla 3.2, junto a los resultados del análisis ANOVA.

Tabla 3.2- Análisis químico de la uva producida en cada una de las parcelas estudiadas.

	Sólidos solubles (°Brix)		pH		mg de antocianos/g de baya		mg de antocianos por baya		Compuestos Fenólicos /g de baya		Compuestos Fenólicos/ baya	
NOD	24,52±2,61	a	3,47±0,10	a	0,97±0,64	a	1,73±1,17	a	0,94±0,52	ab	1,68±0,94	ab
CON	24,82±1,71	a	3,44±0,06	a	1,44±0,47	a	2,46±0,78	a	1,48±0,47	b	2,53±0,77	b
EE	24,48±1,48	a	3,44±0,08	a	0,93±0,34	a	1,58±0,57	a	0,98±0,32	ab	2,26±0,53	ab
CH	23,83±1,24	a	3,51±0,03	a	0,69±0,21	a	1,25±0,37	a	0,76±0,21	a	1,37±0,37	ab
AA	23,40±0,53	a	3,47±0,05	a	0,66±0,26	a	1,11±0,38	a	0,73±0,24	a	1,23±0,35	a

Letras iguales indican que no hay diferencias estadísticamente significativas entre los valores.

NOD: parcela no degradada. CON: parcela control degradada. EE: parcela recuperada con estiércol.

CH: parcela con cubierta vegetal de cebada y haba. AA: parcela con cubierta vegetal de avena y alfalfa.

El pH y los grados Brix se consideran índices de maduración tecnológica de la uva (Hidalgo, 2006). Se observa que en los grados Brix, en el pH y en los mg de antocianos, tanto por gramo de baya, como por baya, no hay diferencias significativas. El pH es ligeramente más alto que el medido por Martínez *et al* en 0,2-0,3 puntos, y los grados Brix fueron ligeramente altos comparados con los datos de Manzanos *et al*, (2013).

Por otro lado, se observa que en los datos de compuestos fenólicos por baya y por gramo de baya existen diferencias significativas. Las uvas de la parcela control degradada y sin tratamiento de recuperación presenta los valores más elevados de compuestos fenólicos y en las Figuras 3.7 y 3.8 se muestran estas diferencias.

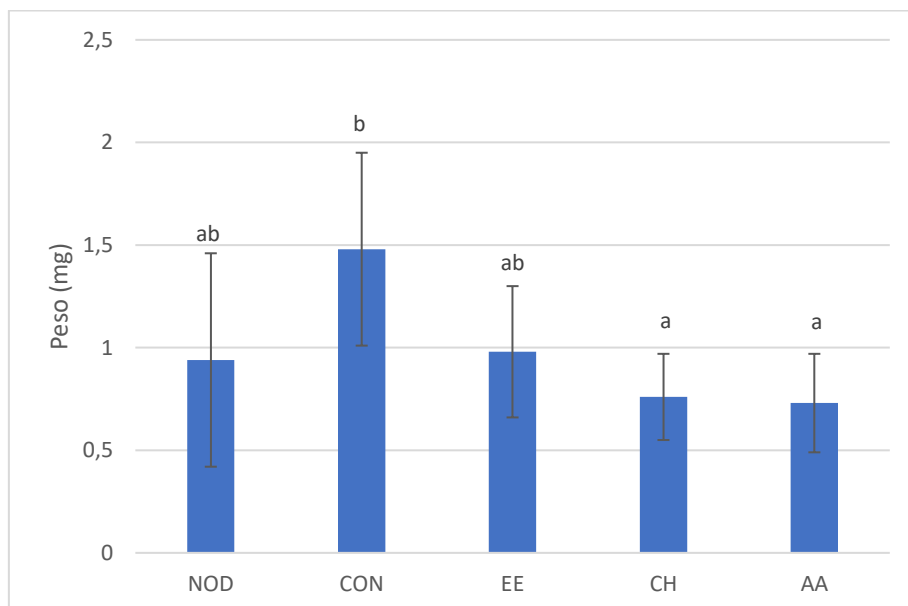


Figura 4.7.- Concentración en mg de compuestos fenólicos por gramo de baya. NOD: parcela no degradada. CON: parcela control degradada. EE: parcela recuperada con estiércol. CH: parcela con cubierta vegetal de cebada y haba. AA: parcela con cubierta vegetal de avena y alfalfa.

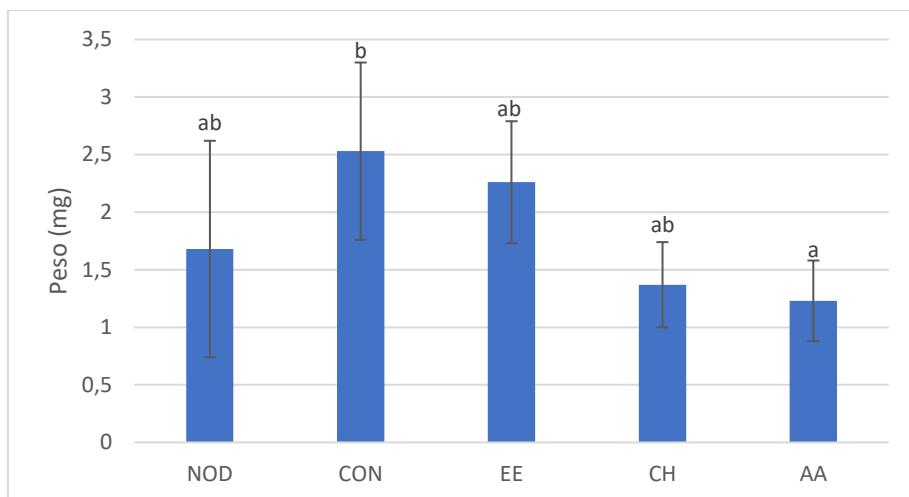


Figura 4.8.- Concentración en mg de compuestos fenólicos por baya. NOD: parcela no degradada. CON: parcela control degradada. EE: parcela recuperada con estiércol. CH: parcela con cubierta vegetal de cebada y haba. AA: parcela con cubierta vegetal de avena y alfalfa.

Cabe señalar aquí que la disminución del vigor de la vid tiene un impacto en el contenido de proantocianidinas en el hollejo y el contenido de estos compuestos fenólicos aumenta con la disminución del vigor de la planta (Teixeira *et al.*, 2013), lo cual puede explicar los valores más elevados en contenido de compuestos fenólicos que se obtienen de las uvas de la parcela degradada y sin ningún tratamiento de recuperación.



### 3. Datos meteorológicos

Los datos meteorológicos del viñedo, obtenidos de la página web oficial del gobierno de La Rioja para la zona de San Vicente de la Sonsierra, del periodo comprendido entre febrero de 2017 y febrero de 2018, se recogen en la tabla 4.

Tabla 4.- datos meteorológicos

Fecha	Humedad relativa media (%)	Precipitación acumulada (l/m <sup>2</sup> )	Radiación media (w/m <sup>2</sup> )	Temperatura suelo		
				Máx	Med	Mín
feb-17	78	41,9	95,384	12	7,3	3,5
mar-17	68	52,3	170,321	16	10,4	5,2
abr-17	58	14,8	254,413	21,1	14,3	7,1
may-17	61	46,2	255,087	27,4	18,1	7,6
jun-17	66	73,7	272,279	31,4	23	13,8
jul-17	60	32,7	285,193	31,9	24,1	13,8
ago-17	61	47,7	248,889	33	24,5	17,2
sep-17	68	7,6	194,669	26,2	18,8	12,3
oct-17	70	28,8	142,384	24	16,1	8,7
nov-17	76	39,9	84,075	16,9	8,2	2,7
dic-17	83	80,2	59,235	10,5	5,2	1,5
ene-18	82	99,8	71,709	11,6	6	2,1
feb-18	80	46,7	84,571	12,5	5	1,5

Como se puede percibir de las gráficas, los datos de la humedad tienen una tendencia opuesta a la de radiación media y temperatura media del suelo; mientras que en primavera y verano hay poca humedad, hay mucha temperatura ya radiación, en otoño e invierno la situación se invierte. Respecto a la precipitación, el mínimo fue en otoño, y en verano hubo precipitaciones moderadas, y en invierno se obtuvieron los máximos. Fueron datos inesperados, ya que se esperaban los máximos en otoño y los mínimos en verano.

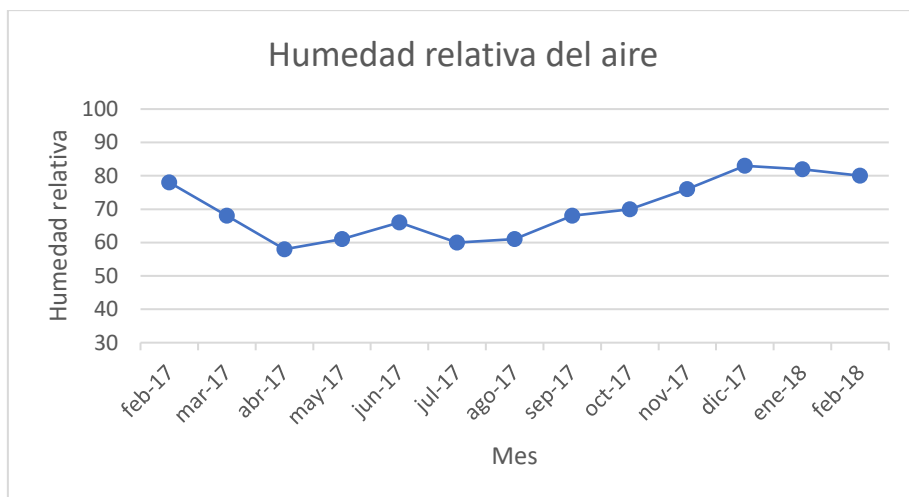


Figura 5.1.- Humedad relativa del aire en el viñedo durante los 12 meses anteriores a la recogida de la muestra.

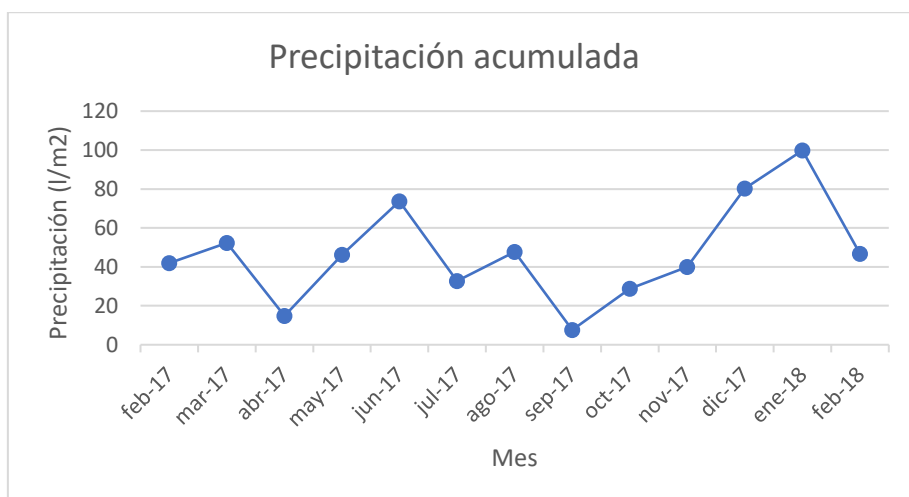


Figura 5.2.- Lluvia recogida en el viñedo durante los 12 meses anteriores a la recogida de la muestra.

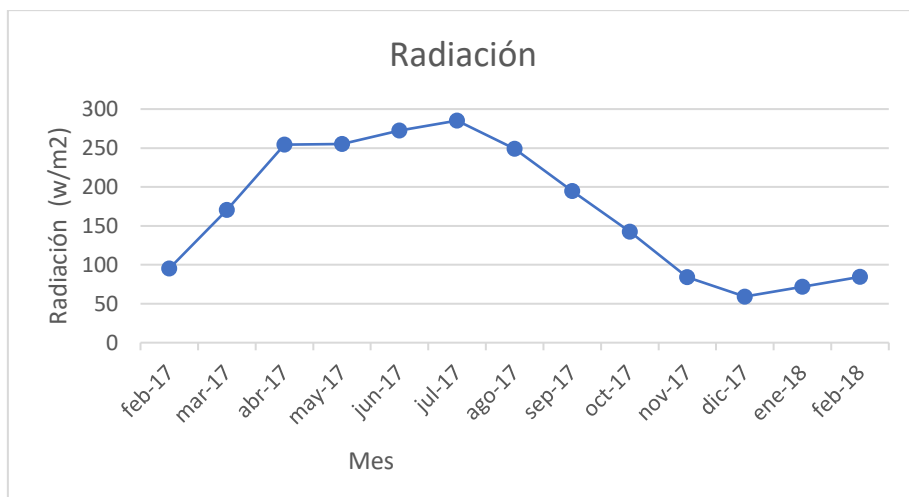


Figura 5.3.- Radiación recibida en el viñedo durante los 12 meses anteriores a la recogida de la muestra.

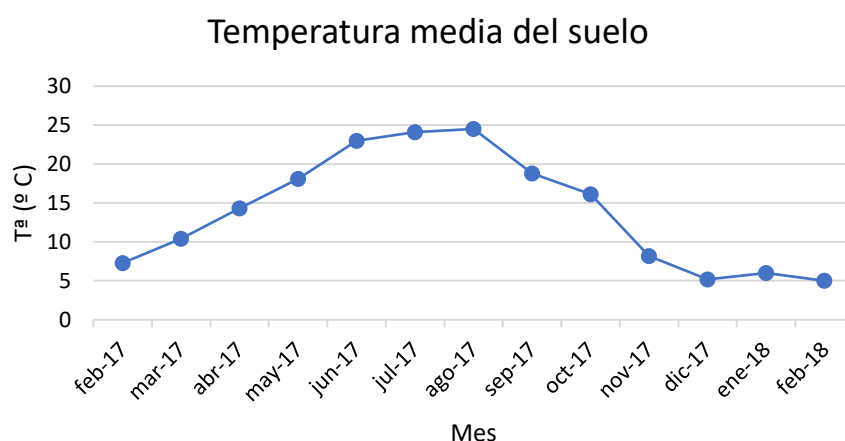


Figura 5.4.- Temperatura del suelo del viñedo durante los 12 meses anteriores a la recogida de la muestra

Los parámetros climáticos más importantes para Hidalgo (2006), en el apartado de medidas microclimáticas directas, son la temperatura, la humedad relativa, la radiación solar, la velocidad del viento y la medición de la clorofila, de los cuales en este trabajo se miden los primeros tres, además de la precipitación.

Si se comparan los datos meteorológicos con los de años anteriores, se observa que la humedad relativa del aire es la normal en verano, otoño e invierno, pero no en los meses de marzo, abril y mayo, donde son marcadamente bajos.

La precipitación acumulada varía mucho de un año a otro, teniendo una diferencia de más de 100 litros en el mismo mes de distintos años. En general se puede decir que en primavera y otoño (febrero, marzo, abril, septiembre, octubre, noviembre) se tuvieron precipitaciones por debajo de la media, y verano e invierno por encima de la media (mayo, junio, julio, agosto, diciembre y enero). Respecto a la radiación acumulada, los datos son parecidos a los de años anteriores, excepto en marzo y abril, donde son bastante mayores. Estos datos se corresponden con los datos de humedad relativa.

Los datos de temperatura del suelo se corresponden bastante bien con el promedio de los años anteriores. Si nos fijamos en los meses de marzo y abril, que en los parámetros de humedad relativa y radiación despuntaban, también destacan al tener más de un grado más del promedio de los últimos años, en especial el mes de marzo.

#### 4. Análisis de componentes principales

La figura 3.17 muestra la gráfica del análisis de componentes principales. CP1 explica el 48,7 % de la varianza y se relaciona con la fertilidad, número de racimos y con la producción, mientras que CP2 explica el 33,6 % de la varianza y se relaciona con los compuestos fenólicos por baya y por gramo de baya.

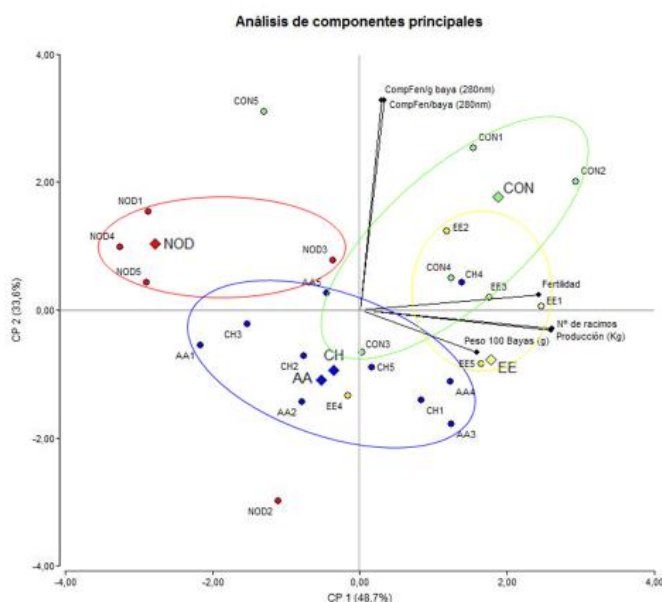


Figura 6.- Resultados del análisis de componentes principales.

NOD: parcela no degradada (rojo). CON: parcela control degradada (verde). EE: parcela recuperada con estiércol (amarillo). CH: parcela con cubierta vegetal de cebada y haba. AA: parcela con cubierta vegetal de avena y alfalfa (ambas en azul). Los rombos representan los centroides de grupo.

El análisis muestra que las parcelas recuperadas con las cubiertas verdes (CH y AA) dieron resultados semejantes y se agrupan en una zona intermedia entre el 3º y el 4º cuadrante. La parcela recuperada con el abono orgánico de estiércol (EE) muestra los valores más elevados de fertilidad, producción de uva (Kg, nº de racimos y peso de 100 bayas), tal y como también se ha mostrado en la tabla 3, y se correlaciona con la mayor población bacteriana del suelo de esta parcela que de las otras parcelas. En el primer cuadrante y asociado al contenido más elevado de compuestos fenólicos de las uvas, se encuentra la parcela control (CON) degradada y sin tratamiento de recuperación. En el 2º cuadrante, en la zona de baja fertilidad y baja producción de uva, se encuentra la parcela no degradada (NOD), cuyo grupo de puntos se encuentra más claramente separado y no intersecciona con los otros grupos. Considerados globalmente, estos resultados muestran pequeñas diferencias entre las parcelas, todas ellas sometidas al manejo ecológico del viñedo, con la misma localización geográfica y con el cultivo de la misma variedad Tempranillo, y concuerdan con estudios recientes que indican que las grandes variaciones en la microbiota del suelo del viñedo se deben sobre todo a la localización geográfica del viñedo y a la variedad del cultivo (Mezzasalma *et al.*, 2018).

## CONCLUSIONES

1. El cultivo con abono orgánico fue el que presentó los valores más elevados de fertilidad, de producción de uva y de las poblaciones de microorganismos fijadores de nitrógeno, descomponedores y aerobios totales.
2. Los cultivos con cubiertas vegetales de cereal y leguminosa dieron resultados semejantes entre si, y valores intermedios en los parámetros estudiados.
3. El suelo control no degradado y sin tratamientos fue el que mostró los valores más bajos de producción de uva y fertilidad, y el cultivo control degradado y sin tratamientos mostró los valores más altos de contenido en compuestos fenólicos de las uvas.
4. En todos los casos las poblaciones de levaduras presentes en el suelo tres meses después de la vendimia, fueron elevadas (más de  $10^4$  UFC/g de tierra seca), demostrando con ello que el suelo es un enorme reservorio de levaduras.
5. El manejo del cultivo del viñedo tiene un efecto sobre la microbiota presente en el suelo, y esta microbiota, especialmente las levaduras, podría desempeñar un papel relevante en el proceso de fermentación y elaboración del vino en la bodega.

## Bibliografía

- Belda, I., Zarraonaindia, I., Perisin, M., Palacios, A. and Acedo, A. (2017). From Vineyard Soil to Wine Fermentation: Microbiome Approximations to Explain the “terroir” Concept. *Microbiome in Enology and Viticulture Microbiol.* 8:821. doi: 10.3389/fmicb.2017.00821.
- Burns K. N., Bokulich N. A., Cantu D., Greenhut R. F., Kluepfel D. A., O'Geen A. T., Strauss S. L., and Steenwerth K. L. (2016). Vineyard soil bacterial diversity and composition revealed by 16S rRNA genes: differentiation by vineyard management. *Soil Biology and Biochemistry* 103, 337348. doi: 10.1016/j.soilbio.2016.09.007.
- Burns, K. N., Kluepfel, D. A., Strauss, S. L., Bokulich, N. A., Cantu, D., & Steenwerth, K. L. (2015). Vineyard soil bacterial diversity and composition revealed by 16S rRNA genes: differentiation by geographic features. *Soil Biology and Biochemistry*, vol. 91, pág. 232-247.
- Corneo, P. E., Pellegrini, A., Cappellin, L., Roncador, M., Chierici, M., Gessler, C., & Pertot, I. (2013). Microbial community structure in vineyard soils across altitudinal gradients and in different seasons. *FEMS microbiology ecology*, vol. 84 n°3, pág. 588-602.
- Feng, Y., Motta, A. C., Reeves, D. W., Burmester, C. H., Van Santen, E., & Osborne, J. A. (2003). Soil microbial communities under conventional-till and no-till continuous cotton systems. *Soil Biology and Biochemistry*, vol. 35 n° 12, pág. 1693-1703.
- Hidalgo, J. (2006). Factores que influyen en la maduración del racimo. *La calidad del vino desde el viñedo. Primera edición. Mundi-prensa, Madrid*, pág. 121-186.
- Ibáñez, S., Peregrina, F., & García-Escudero, E. (2009) Respuesta de Vitis vinífera L., cv. Tempranillo, a sistemas de mantenimiento del suelo a través de cubierta vegetal en el ámbito de la DO Ca. Rioja. VI congreso ibérico de ciencia hortícola, Logroño. Actas de horticultura 54.543, pág. 395-396.
- Jhonson, C. (2009). *Biology of soil science*. Oxford Book Company. Capítulo 2

- Kottek M., Grieser J., Beck C., Rudolf B. and Rubel F. (2006); "World Map of the Köppen-Geiger climate classification updated". *Meteorologische Zeitschrift*, Vol. 15, No. 3, pág. 259-263.
- Likar, M., Stres, B., Rusjan, D., Potisek, M., & Regvar, M. (2017). Ecological and conventional viticulture gives rise to distinct fungal and bacterial microbial communities in vineyard soils. *Applied Soil Ecology*, vol. 113, pág. 86-95.
- Lissarrague Garcia-Gutierrez, J. R. (2012). Consecuencias del déficit hídrico en viñedos de zonas cálidas y estrategias de riego en función de los objetivos de la producción de uva. En: "III Jornadas de Riego y Nutrición: vid y olivar, Guadajir - Badajoz.
- Lopes, C. M., Santos, T. P., Monteiro, A., Rodrigues, M. L., Costa, J. M., & Chaves, M. M. (2011). Combining cover cropping with deficit irrigation in a Mediterranean low vigor vineyard. *Scientia Horticulturae*, vol 129 nº4, pág. 603-612.
- Lupatini, M., Korthals, G.W., de Hollander, M., Janssens, T.K.S., and Kuramae, E.E. (2017). Soil microbiome is more heterogeneous in organic than in conventional farming system. *Frontiers in Microbiology* 7:2064. doi: 10.3389/fmicb.2016.02064.
- Manzanos, P. B., González, J. C. S., & de Toda Fernández, F. M. (2013). Caracterización vitícola y enológica de cuatro variedades minoritarias conocidas como Tempranillo en la DO Ca Rioja. *Zubía*, nº 25, pág. 21-30.
- Martínez, J., López, E., Baroja, E., Pérez, D., Chávarri, J. B., & García-Escudero, E. (2014). Evaluación agronómica y enológica de la variedad Tempranillo blanco (*Vitis vinifera* L.) y de otras variedades minoritarias blancas de la DO Ca. Rioja. In *I Jornada del Grupo de Viticultura y Enología: Comunicaciones, Logroño, 19 y 20 de noviembre, 2014* (pp. 27-33). SECH (Sociedad Española de Ciencias Hortícolas).
- Mezzasalma V, Sandionigi A, Guzzetti L, Galimberti A, Grando MS, Tardaguila J, Labra M. 2018. Geographical and Cultivar Features Differentiate Grape Microbiota in Northern Italy and Spain Vineyards. *Front Microbiol.* 9:946. doi: 10.3389/fmicb.2018.00946. eCollection 2018.



- Morlat, R., & Jacquet, A. (2003). Grapevine root system and soil characteristics in a vineyard maintained long-term with or without interrow sward. *American Journal of Enology and Viticulture*, vol 54, nº 1, pág. 1-7.
- Ojeda, H. (2007). Riego cualitativo de precisión en la vid. *Revista Enología*, Vol. 1, pág. 14-17.
- Paul, E. A. (2014). *Soil microbiology, ecology and biochemistry*. Academic press. Capítulo 1.
- Schlegel, H. G., & Zaborosch, C. (1997). *Microbiología general*. Omega. Capítulo 5.
- Stanier, R. Y.; Ingraham, J. L.; Wheelis, M. L.; Painter, P. R.; (1992). Microbiología, Barcelona. *Reverté, SA*. Capítulo 8.
- Teixeira A, Eiras-Dias J, Castellarin SD, Gerós H. 2013. Berry phenolics of grapevine under challenging environments. *Int J Mol Sci*. 14(9):18711-39. doi: 10.3390/ijms140918711.
- Tognetti, C., Laos, F., Mazzarino, M. J., & Hernandez, M. T. (2005). Composting vs. vermicomposting: a comparison of end product quality. *Compost Science & Utilization*, vol. 13 nº 1, pág. 6-13.
- Torsvik, V., & Øvreås, L. (2002). Microbial diversity and function in soil: from genes to ecosystems. *Current opinion in microbiology*, vol 5 nº 3, pág. 240-245.
- Trioli, G.; Hofmann, U. (2009) Código de buenas prácticas vitivinícolas ecológicas. Editorial Hofmann U. ECOVIN-Asociación Federal de productores de vino ecológico, Wormserstrasse, vol. 162, pág. 55276.
- White, R.E. 2015. Understanding Vineyard Soils. Second Edition. Oxford University Press, (New York). ISBN 978-0-19-934206-8.
- Young, I. M., & Crawford, J. W. (2004). Interactions and self-organization in the soil-microbe complex. *Science*, vol 304 nº 5677, pág. 1634-1637.

## Webs visitadas

Ministerio de Agricultura, Pesca, Alimentación y Medio Ambiente (MAPAMA)

<http://www.mapama.gob.es/es/>

Gobierno de La Rioja <http://www.larioja.org/es>

Denominación de Origen Calificada Rioja <https://es.riojawine.com/es/home.html>